

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : **09-224644**
 (43) Date of publication of application : **02.09.1997**

(51) Int.Cl. **C12M 1/00**
C12N 15/09
C12Q 1/68

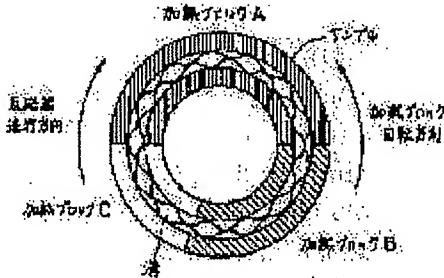
(21) Application number : **08-034723** (71) Applicant : **DAINIPPON PRINTING CO LTD**
 (22) Date of filing : **22.02.1996** (72) Inventor : **NAKAGAWA YOSHIKAZU
OKA MOTOHIRO**

(54) PCR DEVICE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a polymerase chain reaction(PCR) device capable of rapidly carrying out many reactions at the same time and useful in a field related to biochemistry by installing a reaction solution feed part, a reactor closing part and a heating part and connecting each part with a transporting means.

SOLUTION: This PCR device consists of a reaction solution feed part having a sharp nozzle, a reactor closing part and plural platy heating blocks A, B and C. Heating units enabling to heat in order the reactor at a specified temperatures by setting each heating block A, B and C and preferably a measuring unit and a reaction solution recovery unit are installed and each unit is connected with a transporting means. It is preferable to construct the heating blocks A, B and C and the reactor to be movable.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] **07.02.2003**

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] **3813655**

[Date of registration] **09.06.2006**

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-224644

(43)公開日 平成9年(1997)9月2日

(51) Int.Cl.⁶
 C 12 M 1/00
 C 12 N 15/09
 C 12 Q 1/68

識別記号
 7823-4B
 9282-4B

F I
 C 12 M 1/00
 C 12 Q 1/68
 C 12 N 15/00

技術表示箇所
 A
 A
 A

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平8-34723

(22)出願日 平成8年(1996)2月22日

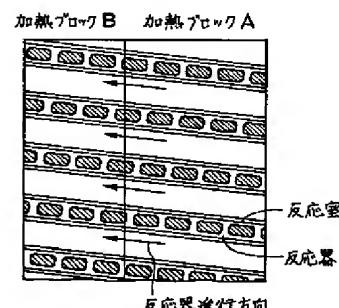
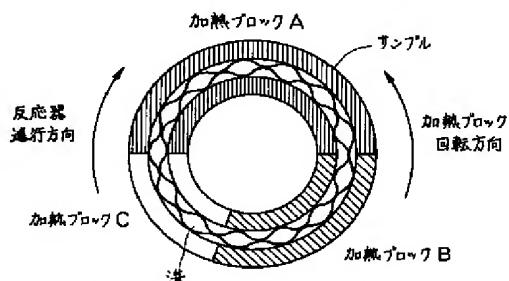
(71)出願人 000002897
 大日本印刷株式会社
 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
 (72)発明者 中川 美和
 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
 大日本印刷株式会社内
 (72)発明者 岡 素裕
 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
 大日本印刷株式会社内
 (74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 P C R装置

(57)【要約】

【課題】 微量溶液を用いる生化学関連の反応系において、大量のサンプルの反応を同時もしくは連続的に処理可能な自動装置を提供する。特に、P C R法のように、多段階に加熱温度を変化させる必要のある反応に適するような反応装置を提供する。

【解決手段】 反応液供与部、反応器密閉部、加熱部を設け、それぞれを運送手段が連結しており、場合によって反応液回収部及び測定部を有する反応装置である。特に、加熱部は複数のプレート状の加熱ブロックからなるもの、螺旋状に移動する空隙を有した加熱ブロックからなるもの、及び複数の水浴からなるものを開発した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）装置において、装置が反応液供与部、反応器密閉部、加熱部を設け、それぞれを運送手段が連結してなる反応装置。

【請求項2】 加熱部が、複数のプレート状の加熱ブロックからなり、各加熱ブロックが所定の温度に設定され、反応器を順次所定の温度で加熱するようにした請求項1に記載の反応装置。

【請求項3】 加熱部が、反応器が螺旋状に移動する空隙を有した加熱ブロックであり、螺旋部分の異なる位置で所定の温度に設定され、反応器を順次所定の温度で加熱するようにした請求項1に記載の反応装置。

【請求項4】 加熱部が複数の水浴からなり、各水浴は所定の温度及び／又は所定の水浴時間に設定され、反応器を順次所定の温度で加熱するようにした請求項1に記載の反応装置。

【請求項5】 測定部を有する請求項1に記載の反応装置。

【請求項6】 反応液回収部を有する請求項1に記載の反応装置。

【請求項7】 供与部のノズルが銳利である請求項1に記載の反応液供与部。

【請求項8】 加熱ブロックを移動するようにした請求項3に記載の反応装置。

【請求項9】 反応器を移動するようにした請求項3に記載の反応装置。

【請求項10】 加熱ブロックの移動が一軸を中心とした円運動によるものである請求項8に記載の反応装置。

【請求項11】 反応器の移動が反応器を吸着することにより行う請求項9に記載の反応装置。

【請求項12】 反応器の移動を、螺旋状体が反応器の進行方向と逆に回転し、かつ振動を伴ったものによる請求項4に記載の反応装置。

【請求項13】 プレート状の加熱ブロックが、複数のベルトコンベア上に載置された請求項2に記載の反応装置。

【請求項14】 プレート状の加熱ブロックが、中心軸に取り付けられ、中心軸を中心として回転するようにした請求項2に記載の反応装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子工学、タンパク質工学、細胞工学、免疫等の生化学関連分野において、比較的微量の溶液で加熱を行う各種反応、例えば酵素反応、免疫反応、化学反応等、特にP C R法を行う場合に使用する反応装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 臨床検査、生化学、遺伝子工学の研究分野で酵素、抗体を利用した反応による目的物質の増幅、活性測定は広く用いられている。これらの実験操作には

通常、容量1.5m lから2.0m l程度の微量試験管、または容量0.2m l程度のマイクロプレートウェルが用いられている。

【0003】しかし、臨床検査やゲノム解析のような多サンプル高速処理、自動化が要求される場合これら実験室レベルの反応器では、反応器の開閉が自動化になじみにくい、反応器が識別しにくい、サンプル数が限定される等の問題点がある。また、マイクロプレートウェルでは蓋に密閉手段がないためP C R（Polymerase Chain Reaction）のような高温の反応になじみにくい。また、微量試験管を反応器として用いる場合反応後の生成物を光学的に測定する場合、別のキュベットに移し替えるという操作が新たに発生する。

【0004】P C R法は、酵素反応を利用して目的の核酸を增幅させる手段である。具体的には、反応器内に、増幅させようとする標的核酸、例えば、標的D N A；標的D N Aと特異的に結合する少なくとも2種のオリゴヌクレオチドプライマー；緩衝液；酵素；d A T P, d C T P, d G T P, d T T Pのようなデオキシリボヌクレオチド3'りん酸等を加えて、①95℃前後でのD N Aの1本鎖への変性、②50℃前後での1本鎖D N Aとプライマーとのアニーリング、③70℃前後でのD N AポリメラーゼによるD N Aの伸長反応、の3段階の反応を、加熱温度を変化させることにより繰り返して、所望量の標的D N Aが得られるまで増幅させるものである。

【0005】各段階における加熱温度は標的核酸の種類、配列、長さ等により変化するため上記の温度には限られないが、単に加熱温度を変化させる操作のみでD N Aを大量に、かつ生物的要因に左右されずに増幅できるため、クローニングに替わる核酸増幅法として広く用いられている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、微量溶液を用いる酵素、免疫等の生化学関連の反応系において臨床検査、大規模生化学研究のように大量のサンプルの反応を同時もしくは連続的に処理可能な反応液の供与、反応器の密閉、温度制御、反応溶液の加熱、光学測定、サンプルの識別を連続的に行う自動装置を提供するものである。特に、P C R法のように、多段階に加熱温度を変化させる必要のある反応に適するような反応装置を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 上記課題に鑑み、本発明は、微量溶液の充填、密閉、回収操作が容易で一つの空隙を有する包装単位が連続した反応器を提供することであり、その反応器を使用して連続反応を円滑に実施し得るような加熱装置を提供する。

【0008】反応器の形態の一つは、図2に示すように、少なくとも一個の凹部が設けられた基材とフィルムからなり、前記フィルムが前記基材に熱溶着または圧着

されることにより前記四部を密着する事が可能な反応器であり、医薬品の包装形態であるプレススルーパック（P.T.P.）等に類似した構造のものである。

【0009】別の様態は、図3に示すように、開口部を有する空隙を少なくとも一個有する反応器からなり前記開口部が熱溶着、圧着または凹凸嵌合により閉塞されて前記空隙を密閉する事が可能である反応器であり、これは、例えば、医薬品の包装形態であるユニットドース点眼薬包装体やポーションパック等に類似した構造のものである。両反応器とも反応単位は所望量だけ設定することが可能である。

【0010】反応装置は反応に伴う一連の操作を連続的に行うべく、反応液供与部、反応器密閉部、加熱部、反応液回収部及び運送手段からなり、場合によって分光測定部、ID記録部、ID読みとり部分を有する（図1）。以下に各部分の詳細を記す。

【0011】反応液供与部は所望の反応を構成する。図4に示すように、各試薬をディスペンサーにより順次空隙に滴下していく。吐出時間等の吐出条件は試薬の粘性等の正常により最適化される。

【0012】ノズル形状は特に限定されないが、例えば反応器にすでに試薬の一部が収納されており、更に個別に試薬を追加するような場合、例えばPCR反応において塩基、酵素等の必須の溶液はあらかじめ反応器に収納されており、更に標的DNA、プライマーを追加で反応溶液に加えるような場合は、反応器の密閉部分を穿刺して試薬を加える。従ってこのような場合はノズルの先端が鋭利であることが好ましい。

【0013】また、処理速度を上げるために複数のノズルで同一試薬、またサンプルに応じた個々の試薬を同時に複数サンプルに吐出する事も可能である。反応液のはすめプログラムされていて、反応単位に設置されたIDコードで所望の構成成分を所望量加えることも可能である。

【0014】反応器本体、あるいはカバーフィルムに熱可塑性樹脂、接着剤、粘着剤が塗布、あるいは成型品の凹凸嵌合により圧着、熱圧着により密閉可能なように設計されている。

【0015】密閉手段が熱融着の場合（図5）、熱可塑性樹脂が融解する温度の熱を発する治具が所望の部分を圧迫する。この場合、ヒートシーラーは治具形状により反応器一単位ごと、あるいは複数の反応器を同時に熱融着する事が可能である。一般的に、酵素等の変性、加熱による不適当な反応開始を避けるため、ヒートシーラーの熱で反応器の液温上昇を防止するよう、空隙部分の近傍に加熱部分が来ないよう治具が設計される。

【0016】密閉手段が接着、粘着、成型品の凹凸嵌合の場合、反応器は開口部等を圧迫し密閉することができる。熱融着の場合と同様圧着は個々に所望の密閉部分を圧迫する、もしくは複数反応単位を同時に圧着する事も

可能である。圧迫の際に空隙部分を圧迫し反応器を破裂させないような治具形状が考慮されなければならない。

【0017】反応加熱部分は所望の温度、時間の反応条件による反応場を提供する。加熱部分は加熱ブロック、恒温室、恒温水浴等が考えられる。反応時間は、反応器が、加熱ブロックと接触する時間あるいは加熱ブロック内に設けられた反応器が移動可能な空間を通過する時間、又は恒温室、水浴中に存在する時間、または移動しながら通過する時間によって決定される。反応条件が複数の段階的な反応の場合にはそれぞれの反応条件の加熱ブロック、恒温室、水浴が設けられる。

【0018】またPCRのようなサイクル反応の場合、複数の反応条件に設定された加熱ブロックがサイクル的に反応器に接触する。あるいは、上述の反応場を一定速度で循環することでサイクル反応が進行する。このようなサイクル反応の場合の加熱部を例示する。

【0019】（加熱部①）図6（a）、（b）

一定数の反応単位を収納するよう設計された反応単位がサイクル反応の数の倍数存在し、図に示すように、運搬手段により第一反応（加熱ブロックA）の上に反応器が設置されると、他の反応単位から切り離され、反応器が一定時間、一連の反応の加熱ブロック（A, B, C）を移動することによりサイクル反応が行われる。この一連の加熱ブロックの循環または反応器の循環は進行方向に垂直で循環しながら、加熱ブロック群は進行方向に移動していく。切断された次の反応器は新たな加熱ブロック群に供与され同じく加熱ブロック群内を循環することにより反応が進行していく（図6a）。又、プレート状の加熱ブロックが、中心軸に取り付けられ、中心軸を中心として回転するようにする方法もある。（図6b）加熱ブロック群の構成ブロック数、加熱温度、サイクル数は反応に応じて任意に設定可能である。なお、運搬手段としては、例えば吸着による運搬が可能である。

【0020】このようにして反応器は、順次サイクル反応に一定サイクル供されながら、装置内を移動していく。この加熱ブロック群内の循環運動、加熱ブロック群の進行方向は任意の方向に設定できる。

【0021】（加熱部②）図7

図に示すような円筒形（必ずしも円筒形に限定されない）で内部に反応器が螺旋状に移動する空隙を有した加熱ブロックにおいて、サイクル反応の一連の反応条件の数だけ、反応時間の比に応じて円周部分の領域が決定され、一定温度に加熱される。空隙は円柱状の側面を螺旋状に設けられており、サイクル反応全体の反応時間に応じて反応速度が設定される。反応器は空隙の一端から、加熱ブロックに入り所望のサイクル分だけ加熱ブロックを経た後、加熱ブロックを脱出する。なお、反応器を螺旋状に移動させる手段としては、反応器を連結させその最上部の反応器を引き上げる方法、あるいは円筒形を反対方向に振動を与えるながら回転させる方法等がある。

【0022】(加熱部③)図8

図に示すようにサイクル反応の一連の反応条件の数だけ設定された、一定温度の水浴を反応器のラインが通過するように設定されている。ラインは水浴を反応のサイクル数に応じて循環して通過するよう設定されている。一サイクルを構成する反応時間の比率は、水浴中のラインの長さに比例し、一サイクル全体の反応時間はラインの速度により調整可能である。また水浴内のラインの長さは水浴内に設けられたキュームレーターの位置により調整可能である。以上のような構成で必要な数だけ所望の反応条件の場を提供できる。

【0023】反応回収部は反応終了した反応器より個々の反応溶液を回収し電気泳動等の次の反応に供与される。次の操作まで一旦保存する場合や臨床検査のように反応終了後の溶液が不要な場合は回収操作は行われない。

【0024】回収には先端が鋭利なシリンジで反応器の一部を貫通させ反応溶液を吸引させる方法(図9)と空隙を圧迫させ開口部から反応液を取り出す方法がある。後者の場合反応器の一部をくびれさせ弱い力で開口できるような手段を設けていてもよい。回収した溶液はシリンジ状のサンプラーで所望の次の操作部位に供与されるか、あるいは後者の場合は個々の反応器を所望の部位まで持っていき圧迫して反応溶液を供与する。いずれの方法でも回収操作は一包装単位ずつでも複数の包装単位でおこなっても良い。

【0025】反応測定部は反応器内の反応生成物の量を分光学的にモニタリングするのに用いられる。この場合には反応器が光学測定可能なように光透過可能で光路長が一定であることが要求される。図10に示すように反応器のラインの一部に暗室を設け特定波長の光を入射する発光部と受光部を設ける。可視光の光源としてはタンゲステンランプが主に用いられフィルター、プリズム等により特定波長の光が選択される。受光部には光電子増倍管が用いられる。また光ファイバープローブを用いた多波長同時測光システムを用いても良い。また、個々のサンプルの認識のためバーコードやナンバリングを設置してもよい。この場合バーコードは剥離紙のついたロールの状態で提供され、感熱ラベルもしくは熱転写等により印字され、ライン上の特定の反応器に貼付されていく。ナンバリングの場合はインクジェット等が用いられる。またバーコードの読みとりとしてライン上の所望の部位に半導体レーザーの読みとり部を設けてもよい。

【0026】

【実施例】以下、実施例を示して本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0027】

【実施例1】反応器として図2に示すようなポリプロレン製の直径580μmの半球状のウェルを幅方向に12

個、等間隔に設けた幅80mmの長方形、厚さ700μmのシート状成型品を真空成形で作成し、ウェル部分をのぞく成型品の全面にアクリル系粘着剤を塗布した。カバーフィルムは2軸延伸ポリプロピレンフィルムを用いた。以下のようなPCR反応装置を作成した。

【0028】ロール状に巻かれた反応器が搬送手段により以下の各部分を通過するように設定した。反応液供与部分として幅方向のウェルに滴下できるように設定した12連ディスペンサを3組設定し、第一組目には20mMTris-塩酸(pH8.3)3mM塩化マグネシウム0.02%ゼラチンdATP, dCTP, dGTP, dTTPをそれぞれ400μmol/100μl, TaqDNAポリメラーゼ6unit/100μlからなる溶液各25μlをウェルに滴下できるよう設定し、第二組目のディスペンサにはオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子の第3エクソンを含む106bpの前後20merずつの2種のプライマーそれぞれ500pmol/100μl含む溶液を各10μlウェルに滴下できるよう設定した。

【0029】第三組目のディスペンサには50μlの新生児の血液含浸濾紙を0.85%生理食塩水に浸漬して得られた白血球をフェノール抽出して得られたDNA全量を生理食塩水に溶解したサンプルをサンプラーより1サンプルずつ各40μl滴下できるよう設定した。各ウェルの識別のためディスペンサの後に感熱転写でバーコードを印字できるよう設定した。

【0030】密閉部分は反応プレートを幅方向の12サンプルを10列分同時に130℃、荷重2kg/cm²で、10秒間圧着できるヒートシーラーを設定した。またヒートシールした120ウェル分のサンプルはヒートシール直後加熱部分の第一ブロックに収納されるよう設定した。加熱部分は図6(b)に示す装置を作成した。加熱ブロックAは94℃1.5分、Bは43℃2分、Cは73℃2分に設定した。加熱を30サイクル繰り返してPCRを行った。この1組の加熱ブロックを30組準備し、ヒートシール後のサンプルが順次加熱反応に供与されるよう設定した。反応終了後の溶液はマイクロシリジで全量回収され、電気泳動の所定のウェルに供与されるよう設定した。サンプルの認識のため、マイクロシリジの手前にバーコードリーダーを設置した。

【0031】この装置の所定の部分に各試薬を収納し反応を開始した。各反応溶液とブランクとしてPCR反応前の混合溶液をDNAマーカー(λファージDNA/HindIII分解物)とともに0.8%DNAアガロースゲル電気泳動に供与しエチジウムプロマイド染色を行ったところ、PCR反応後の溶液では106bp付近にオルニチントランスカルバミラーゼと考えられるDNA断片が目視検出された。反応前の溶液では確認されなかった。

【0032】

【実施例2】反応器は幅50mm膜厚50μmの2軸延伸ポリプロピレンフィルム／アクリル系接着剤／無延伸ポリプロピレンフィルムの複合フィルムを図3に示すように等間隔に開口部と空隙を形成するようはりあわせた。空隙の大きさは20mm×25mm×10μlであった。

【0033】ロール状に巻かれた反応器が搬送手段により以下の各部分を通過するように設定した。反応液供与部分として3本のディスペンサを3組設定し、1本目には20mM Tris-塩酸(pH 8.3)、3mM塩化マグネシウム、0.02%ゼラチンdATP, dCTP, dGTP, dTTPをそれぞれ400pmole/100μl, Taq DNAポリメラーゼ6unit/100μlからなる溶液各25μlをウェルに滴下できるよう設定し、2本目のディスペンサにはオルニチントランスクカルバミラーゼ遺伝子の第3エクソンを含む106bpの前後20merずつの2種のプライマーそれぞれ500pmole/100μl含む溶液を各10μlウェルに滴下できるように設定した。3本目のディスペンサには50μlの新生児の血液含浸濾紙を0.85%生理食塩水に浸漬して得られた白血球をフェノール抽出して得られたDNA全量を生理食塩水に溶解したサンプルをサンプラーにより1サンプルずつ各40μl滴下できるよう設定した。各ウェルの識別のためディスペンサによるDNAサンプル供与直後にインクジェットでナンバリングできるよう設定した。

【0034】密閉部分は反応プレートを幅方向の12サンプルを10列分同時に130℃、荷重2kg/cm²で、10秒間圧着できるヒートシーラーを設定した。加熱部分は図8に示す装置を設定した。水浴Aは94℃で、Bは43℃、Cは73℃に設定した。アキュームレーターで各水浴中のラインがそれぞれ1.5m, 2m, 2mで各水浴を15回通過するよう設定した。装置全体の搬送速度は1m/分であった。

【0035】この装置の所定の部分に各試薬を収納し反応を開始した。反応後の溶液は密閉したまま、電気泳動に供与するまで冷蔵保存した。

【0036】電気泳動装置を設置後、各反応溶液をマイ*

*クロシリングで全量取り出し、プランクとしてPCR反応前の混合溶液をDNAマーカー(λファージDNA/HindIII分解物)とともに0.8%DNAアガロースゲル電気泳動に供与しエチジウムプロマイド染色を行ったところ、PCR反応後の溶液では106bp付近にオルニチントランスクカルバミラーゼと考えられるDNA断片が目視検出された。反応前の溶液では確認されなかつた。

【0037】実施例1と、同様の条件で各反応溶液、反応前の混合溶液、DNAマーカーをアガロースゲル電気泳動に供与し、エチジウムプロマイド染色を行った結果、PCR反応ごの溶液では106bp付近にオルニチントランスクカルバミラーゼと考えられるDNA断片が目視検出された。反応前の溶液では確認されなかつた。各ウェルのサンプルのエチジウムプロマイド染色の蛍光強度はいずれも同程度であった。

【0038】

【発明の効果】本発明の反応装置を使用することによって、従来反応液供与、反応器密閉、加熱、反応液回収をそれぞれ別個に行っていたのを連続的に行えるようになった。従って、迅速に、且つ的確に多数の反応を同時に実施することができ、多数の反応データを必要とするPCR等において非常に有益な効果を奏するものである。

【0039】

【図面の簡単な説明】

【図1】全体図を示す。

【図2】プレスルーパック型の反応器の斜視図を示す。

【図3】ユニットドース点眼薬包装体型の反応器の斜視図を示す。

【図4】反応液供与部を示す。

【図5】反応器熱融着による密閉部を示す。

【図6】(a)、(b)反応器加熱部の①を示す。

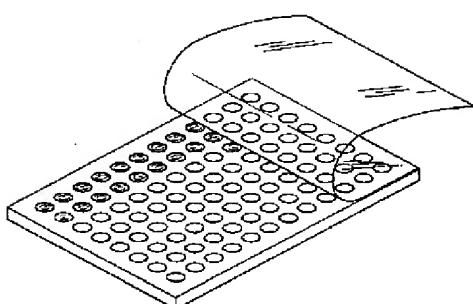
【図7】反応器加熱部の②を示す。

【図8】反応器加熱部の③を示す。

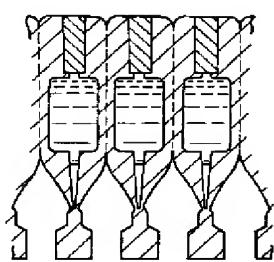
【図9】反応器回収部のうち吸引回収法を示す。

【図10】反応器測定部を示す。

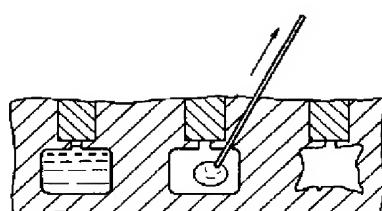
【図2】



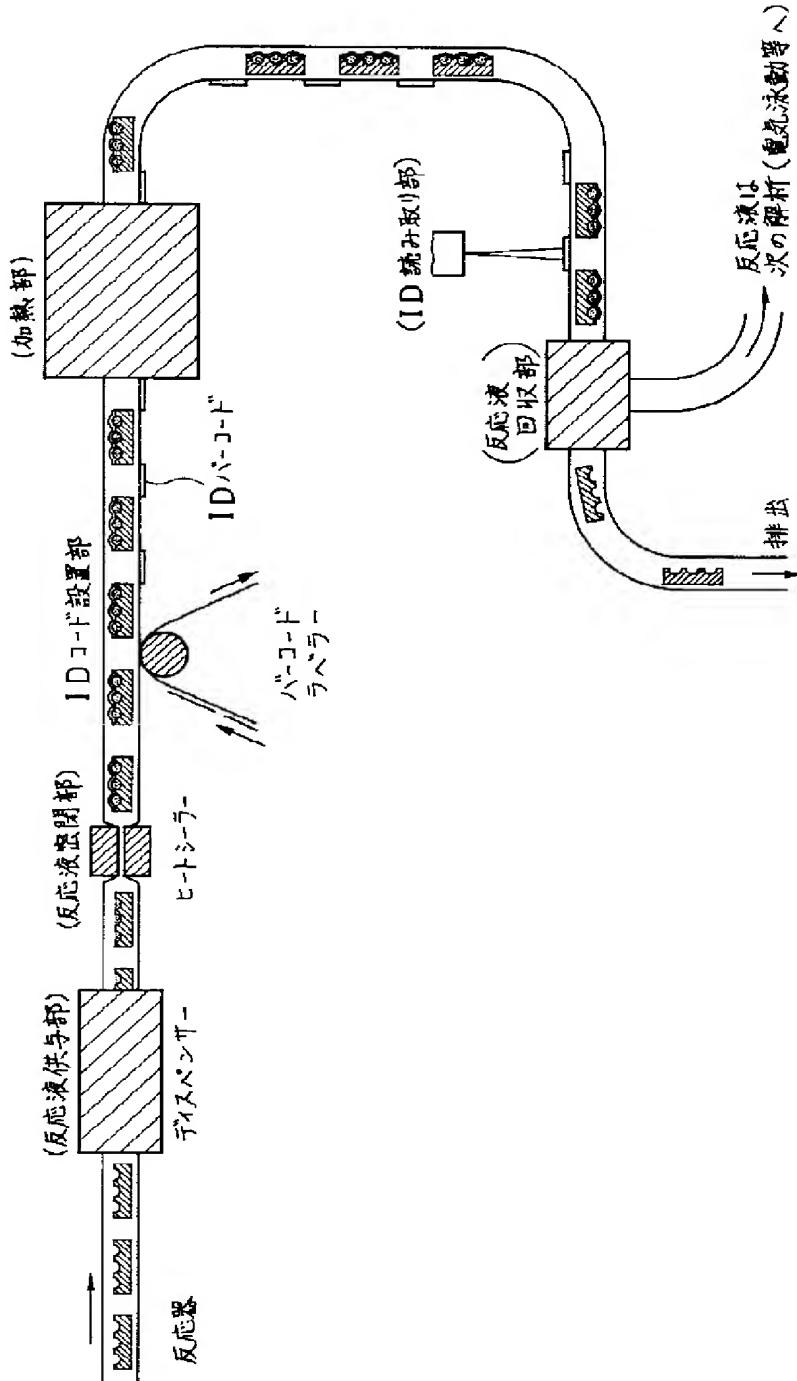
【図3】



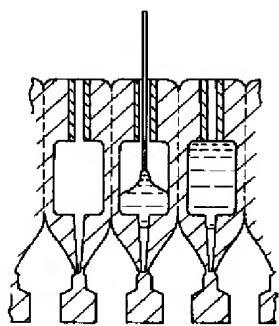
【図9】



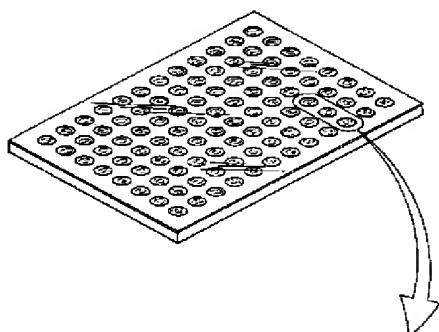
【図1】



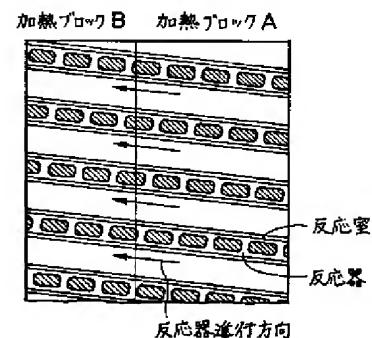
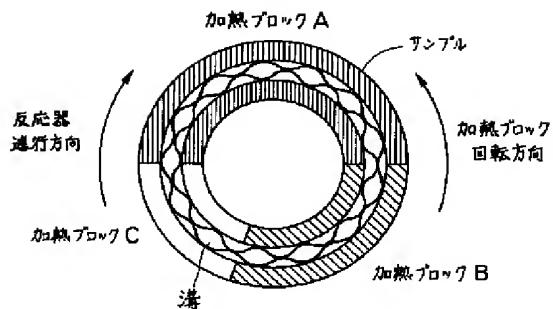
【図4】



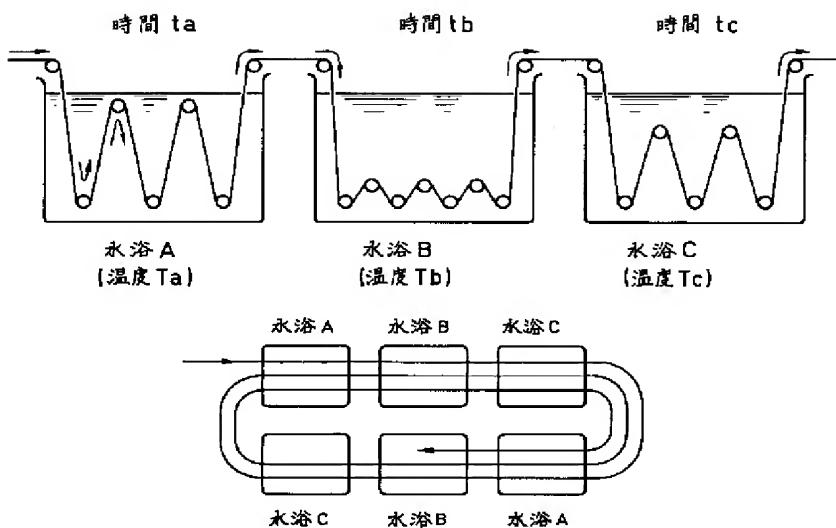
【図5】



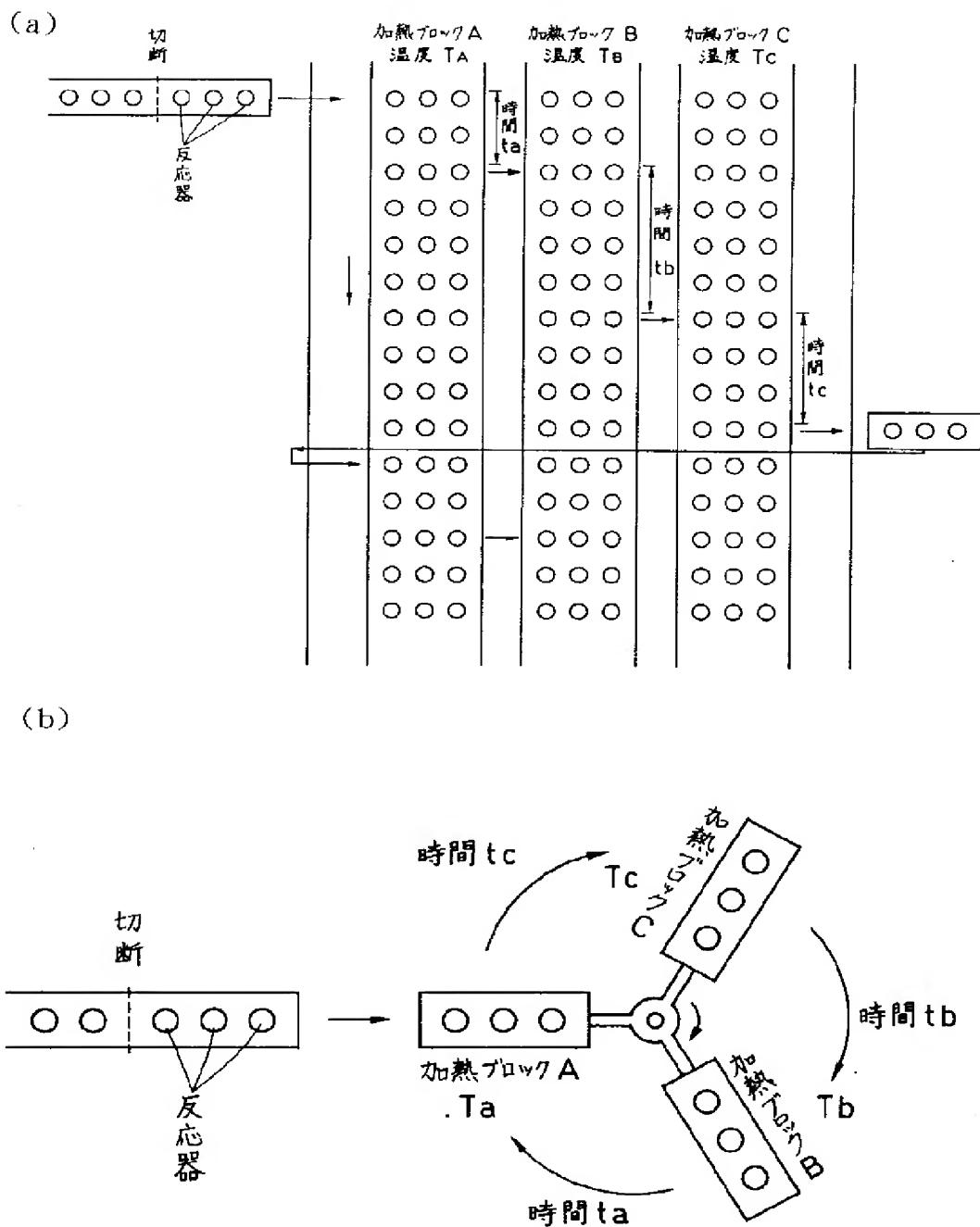
【図7】



【図8】



【図6】



【図10】

